# WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM Internationales Büro

INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation 6:

C12N 15/82, 9/10, 15/54, A01H 5/00

(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: A2

WO 97/45547

(43) Internationales Veröffentlichungsdatum:

Veröffentlicht

4. Dezember 1997 (04.12.97)

(21) Internationales Aktenzeichen:

PCT/EP97/02749

(22) Internationales Anmeldedatum:

27. Mai 1997 (27.05.97)

(81) Bestimmungsstaaten: AU, CA, CN, IL, JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,

LU, MC, NL, PT, SE).

(30) Prioritätsdaten:

196 21 572.2

29. Mai 1996 (29.05.96)

DE

Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): MAX-PLANCK-GESELLSCHAFT ZUR FÖRDERUNG DER WISSENSCHAFTEN E.V. [DE/DE]; Berlin (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): WILLMITZER, Lothar [DE/DE]; Am Kleinen Wannsee 34, D-14104 Berlin (DE). MÜLLER-RÖBER, Bernd [DE/DE]; Siemensstrasse 71, D-12247 Berlin (DE).

(74) Anwalt: VOSSIUS & PARTNER; Postfach 86 07 67, D-81634 München (DE).

(54) Title: LOCALISED CELL DEATH IN PLANTS

(54) Bezeichnung: LOKALISIERTER ZELLTOD IN PFLANZEN

(57) Abstract

The invention relates to nucleic acid molecules for production of localised cell death in plants, and vectors containing said nucleic acid molecules. It also relates to plant cells and plants which are genetically modified by said nucleic acid molecules.

(57) Zusammenfassung

Es werden Nucleinsäuremoleküle zur Erzeugung eines lokalisierten Zelltods in Pflanzen beschrieben, ebenso wie Vektoren enthaltend derartige Nucleinsäuremoleküle, sowie Pflanzenzellen und Pflanzen, die mit derartigen Nucleinsäuremolekülen genetisch modifiziert sind.

# LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Słowakci
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
ВВ	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland		Republik Mazedonien	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	ML	Mali	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	irland	MN	Mongolei	UA	Ukraine
BR	Brasilien	11.	Israel	MR	Mauretanien	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MW	Malawi	บร	Vereinigte Staaten von
CA	Kanada	IT	Italien	MX	Mexiko		Amerika
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CG	Kongo	KE	Kenia	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik	NZ	Neuseeland	zw	Zimbabwe
CM	Kamerun		Korea	PL	Polen		
CN	China	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CU	Kuba	KZ	Kasachstan	RO	Rumanien		
CZ	Tschechische Republik	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
DE	Deutschland	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DK	Dänemark	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
EE	Estland	LR	Liberia	SG	Singapur		

### Lokalisierter Zelltod in Pflanzen

Die vorliegende Erfindung betrifft Nucleinsäuremoleküle, die bei Expression in Pflanzen zur Erzeugung eines lokalisierten Zelltods führen, sowie Pflanzenzellen und Pflanzen, die solche Nucleinsäuremoleküle enthalten.

Pflanzen werden durchweg von verschiedensten Pathogenen attackiert. Ein besonderes Problem in bezug auf den Angriff von Pflanzen durch Pathogene entsteht bei der heutigen Form der Landwirtschaft, die dadurch charakterisiert ist, daß aufgrund des großflächigen Anbaus von Monokulturen mittels züchterischer Methoden eingebrachte Resistenzen relativ rasch durch Mutationen auf seiten der Schädlinge überkommen werden.

Prinzipiell werden zwei Arten der Resistenz bei Pflanzen unterschieden, die vertikale und die horizontale Resistenz. Bei der vertikalen Resistenz handelt es sich in der Regel um eine Gen-für-Gen-Beziehung in dem Sinne, daß einem bestimmten Avirulenzgen des Pathogens ein bestimmtes Resistenzgen der Pflanze gegenübersteht. Dies bedeutet, daß die vertikale Resistenz in der Regel monogen ist und daher auch am leichtesten durchbrochen wird. Die horizontale Resistenz wird nicht monogen vererbt, sondern in der Regel durch eine Reihe von Loci bestimmt. Die horizontale Resistenz führt zu keiner vollständigen Resistenz, wie dies die vertikale Resistenz vermag, ist jedoch in der Regel, da viele Loci involviert sind, dauerhafter.

Im Falle der vertikalen Resistenz, d.h. im Falle des Vorliegens eines Resistenzgens auf der Seite der Pflanze und eines Avirulenzgens auf der Seite des Pathogens, äußert sich die Resistenz in dem Auftreten von lokalen Nekrosen, die mit

einer hypersensitiven Reaktion seitens der Pflanze einhergehen.

Obwohl die hypersensitive Reaktion, die im folgenden als "HR" bezeichnet wird, in ihren Einzelheiten nicht vollständig verstanden ist, ist es deutlich, daß die pflanzlichen Wirtszellen im Bereich der HR einen raschen Zelltod erleiden. Zum einen führt dieser rasche Zelltod zum Einschluß und damit zur Lokalisierung des Pathogens, zum anderen ist davon auszugehen, daß das Pathogen durch Radikale, die während der HR entstehen, geschädigt wird. Darüber hinaus führt eine HR in vielen Fällen zum Phänomen der sogenannten systemisch erworbenen Resistenz. Diese systemisch erworbene Resistenz wird allgemein nach der englischen Bezeichnung "systemic acquired resistance" als SAR bezeichnet.

Die SAR stellt einen interessanten Spezialfall der pflanzlichen Resistenz gegenüber Pathogenen dar. Kennzeichnend ist dabei, daß eine Pflanze, die eine SAR aufgrund einer Infektion durch ein bestimmtes Pathogen aufweist, die erworbene Resistenz nicht nur gegenüber dem die SAR erzeugenden Pathogen besitzt, sondern gegenüber einem sehr viel breiteren Spektrum von Pathogenen.

Insofern ist die SAR eine sehr erstrebenswerte Reaktion der Pflanze, da sie in vielen Fällen in einer breiten Resistenz mündet, welche einer horizontalen Resistenz nahekommt (vgl. z.B. Ryals et al. (1992) SEB Symposium 49, 205-229.

Die Mechanismen, die zur Bildung der SAR führen, sind partiell verstanden. In vielen Fällen ist gezeigt worden, daß zur Ausbildung einer SAR eine lokale Nekrose von Zellen, verbunden mit einer HR notwendig ist. Eine Nekrose, die allein das Ergebnis einer Verwundung darstellt, oder aufgrund von anderen abiotischen Stressoren induziert wird, ist in der Regel nicht ausreichend zur Erzeugung einer SAR. Des weiteren ist gezeigt worden, daß in vielen Fällen die SAR mit einem erhöhten Niveau an Salicylsäure korreliert (vgl. z.B. Metraux et al. (1990) Science 250, 1004-1006; Malamy et al. (1990) Science 250, 1002-1004). Dies ist auch dadurch gezeigt wor-

den, daß exogene Salicylsäure, wenn sie zu nicht infizierten Pflanzen gegeben wird, eine SAR induzieren kann (vgl. z.B. White (1979) Virology 99, 410-412; Palva et al. (1994) Molecular Plant-Microb. Interactions 7, 356-363). Des weiteren ist beobachtet worden, daß in transgenen Pflanzen, in denen über die Expression einer bakteriellen Salicylat-Hydroxylase die Salicylsäuremenge verringert wurde, keine SAR ausgebildet werden kann (Gaffney et al. (1993) Science 261, 754-756). Die SAR kann auch durch eine Reihe von anderen Chemikalien, wie z.B. 2,6-Dichlor-Isonicotinsäure induziert werden (Uknes et al. (1992), The Plant Cell 4, 645-656).

In der Literatur sind bisher verschiedene Systeme beschrieben worden, die zu einem lokalisierten Zelltod führen. Beispiele dafür sind die Expression einer bakteriellen Ribonuclease in transgenen Pflanzen (Strittmatter et al. (1995) Biotechnology 13, 1085-1089). Ein weiteres System ist die gleichzeitige Expression von Resistenzgenen aus einer Wirtspflanze und korrespondierenden Avirulenzgenen aus Pathogenen (WO 91/15585). Ein spezifisches Beispiel ist die Expression des Avr9-Gens aus dem Pilz Cladosporium fulvum und des Cf-9-Gens aus Tomate (WO 95/31564; für eine Übersicht vgl. auch de Witt (1992) Annual Review in Plant Pathology 30, 301-418, zur Benennung weiterer für eine solche Problemlösung kommender Avirulenz- und Resistenzgene). WO daß die 95/31564 wird in allgemeiner Art beschrieben, Nucleotidsequenz oder -sequenzen, welche im Zusammenhang mit lokalisiertem Zelltod und der Erzeugung von SAR beschrieben werden, ein oder mehrere Gene umfassen können, wobei das spezifische Ausführungsbeispiel das Resistenzgen Cf-9 und das Avirulenzgen Avr9 beschreibt.

Als weitere Beispiele für die Verwendung einer Nucleotidsequenz oder die Kombination von Nucleotidsequenzen, die zu einer Pflanzenzellennekrosis und einer SAR führen, werden in WO 95/31564 folgende mögliche Ansätze genannt: ein Ubiquitin-konjugierendes Enzym, das Gen-VI-Protein aus Cauliflower Mosaic Virus, ein virales Coat-Protein in

gleichzeitiger Gegenwart eines entsprechenden pflanzlichen Resistenzgens, ein bakterielles Hairpin-Protein, das N'-Gen aus Tabak, das Kartoffelvirus-Hüllprotein und die avirulente Dominante, sowie verschiedene Resistenz- und Avirulenzgen-Kombinationen (z.B. <u>Cf-2</u> aus Tomate und <u>Avr2</u> aus C. fulvum, <u>Cf-4</u> aus Tomate und <u>Avr4</u> aus C. fulvum). Des weiteren werden eine RNAse, das Diphtherietoxin sowie Protonenpumpen wie bakterielle Protonenpumpen genannt.

Wie bereits oben beschrieben, ist die SAR ein sehr atrraktives Resistenzphänomen. Das Problem besteht jedoch darin, daß die SAR züchterisch bisher nicht behandelt werden konnte, da vermutlich zu viele Loci involviert und/oder die Genprodukte nicht bekannt sind. Es ist somit eine der Aufgaben der biotechnologischen Forschung, alternative Wege sowohl für einen lokalisierten Zelltod als auch die damit häufig einhergehende SAR aufzuzeigen.

Der vorliegenden Erfindung liegt somit die Aufgabe zugrunde, Nucleinsäuremoleküle bereitzustellen, mit deren Hilfe in Pflanzen oder Pflanzenzellen ein lokalisierter Zelltod und gegebenenfalls zusätzlich eine systemisch erworbene Resistenz (SAR) ausgelöst werden können. Eine weitere Aufgabe der Erfindung besteht darin, Nucleinsäuremoleküle zu liefern, die dazu dienen können, in Pflanzen männliche Sterilität zu erzeugen. Weitere Aufgaben der Erfindung ergeben sich aus der folgenden Beschreibung.

Diese Aufgaben werden durch Bereitstellung der in den Patentansprüchen charakterisierten Ausführungsformen gelöst.

Es wurde überraschend gefunden, daß bestimmte Nucleinsäuresequenzen gezielt zur Auslösung des lokalisierten Zelltods
eingesetzt werden können, indem sie die Erzeugung eines Proteins oder Proteinfragments auslösen, dessen enzymatische
Aktivität den Zelltod bewirkt. Insbesondere konnte experimentell gezeigt werden, daß die Expression einer Nucleinsäuresequenz aus Erwinia amylovora, die eine sekretierte Form

5

einer Levansucrase codiert, in Pflanzen zur Ausbildung einer HR führt, die des weiteren mit dem Auftreten einer SAR gekoppelt sein kann.

Somit betrifft die vorliegende Erfindung Nucleinsäuremoleküle, die Proteine oder Fragmente davon codieren, die bei
Expression zum Absterben der Zelle führen. In einer bevorzugten Ausführungsform handelt es sich bei den erfindungsgemäßen Nucleinsäuremolekülen um Nucleinsäuremoleküle, die
Proteine mit der biologischen Aktivität einer Fructosyltransferase oder eines biologisch aktiven Fragments davon
codieren. In einer besonders bevorzugten Ausführungsform
handelt es sich bei der Nucleinsäuresequenz um eine Nucleinsäuresequenz, die Proteine mit der biologischen Aktivität
einer Levansucrase oder eines biologisch aktiven Fragments
davon codiert, insbesondere einer sekretierten Levansucrase.
Biologisch aktives Fragment bedeutet im Zusammenhang mit
dieser Erfindung, daß die vermittelte biologische Aktivität
zur Erzeugung eines Zelltods ausreicht.

Nucleinsäuresequenzen, die Proteine mit der enzymaitschen Aktivität einer Levansucrase codieren, sind aus verschiedenen Organismen beschrieben worden, so z.B. aus, Bacillus amyloliquefaciens (Tang et al. (1990) Gene 96, 89-93), Bacillus subtilis (Fonet et al. (1984) Biochem. Biophys. Res. Commun. 119, 795-800), Erwinia amylovora (Geier und Geider (1993) Physiol. Mol. Plant Pathol. 42, 387-404; DE-Al 42 27 061).

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform umfaßt ein erfindungsgemäßes Nucleinsäuremolekül die im Beispiel 1 benannte codierende Region aus Erwinia amylovora.

Weiterhin betrifft die vorliegende Erfindung Nucleinsäuremoleküle, deren codierende Regionen sich aufgrund der Degeneration des genetischen Codes von Sequenzen der oben genannten Nucleinsäuremoleküle unterscheiden und die ein Protein oder ein Fragment davon codieren, daß die biologische Aktivität einer Levansucrase aufweist, insbesonder einer sekretierten Levansucrase.

6

Bei der Nucleinsäuresequenz, die ein Protein mit der biologischen Aktivität einer Levansucrase codiert oder ein biologisch aktives Fragment davon, kann es sich auch um Sequenzen handeln, die mit einem der oben beschriebenen Nucleinsäuremoleküle hybridisieren. Der Begriff biologisch aktive Fragmente bezieht sich auf Fragmente, die das Absterben der Pflanzenzelle bewirken können. Der Begriff "Hybridisierung" bedeutet im Rahmen dieser Erfindung eine Hybridisierung unter konventionellen Hybridisierungsbedingungen, vorzugsweise unter stringenten Bedingungen, wie sie beispielsweise in Molecular Cloning: Sambrook et al. (1989) Α Manual, 2. Auflage, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, beschrieben sind.

Nucleinsäuresequenzen, die mit den obengenannten Molekülen hybridisieren, können z.B. aus genomischen oder aus cDNA-Bibliotheken isoliert werden.

Die Identifizierung und Isolierung derartiger Nucleinsäuresequenzen kann dabei unter Verwendung der oben beschriebenen bekannten Nucleinsäuremoleküle oder Teile dieser Moleküle bzw. der reversen Komplemente dieser Moleküle erfolgen, z.B. mittels Hybridisierung nach Standardverfahren (siehe z.B. Sambrook et al., a.a.O.).

Als Hybridisierungssonde können z.B. Nucleinsäuremoleküle verwendet werden, die exakt oder im wesentlichen die oben aufgeführten Nucleotidsequenzen oder Teile dieser Sequenzen aufweisen. Bei den als Hybridisierungssonde verwendeten Fragmenten kann es sich auch um synthetische Fragmente handeln, die mit Hilfe der gängigen Synthesetechniken hergestellt wurden und deren Sequenz im wesentlichen mit der eines bekannten Levansucrase-codierenden Nucleinsäuremoleküls übereinstimmt. Hat man Gene identifiziert und isoliert, die mit den bekannten Nucleinsäuresequenzen hybridisieren, ist eine Bestimmung der Sequenz und eine Analyse der Eigen-

7

schaften der von dieser Sequenz codierten Proteine erforderlich. Hierzu stehen dem Fachmann eine Reihe von molekularbiologischen, biochemischen und biotechnologischen Standardverfahren zur Verfügung.

Die mit den bekannten Nucleinsäuremolekülen hybridisierenden Moleküle umfassen auch Fragmente, Derivate und allelische Varianten der oben beschriebenen DNA-Moleküle, die eine Levansucrase codieren oder ein biologisch, d.h. enzymatisch aktives Fragment davon. Unter Fragmenten werden dabei Teile der Nucleinsäuremoleküle verstanden, die lang genug sind, um ein Polypeptid mit der enzymatischen Aktivität einer Levansucrase oder einer vergleichbaren enzymatischen Aktivität, die lokalisierten Zelltod bedingt, zu codieren. Der Ausdruck Derivat bedeutet in diesem Zusammenhang, daß die Sequenzen dieser Moleküle sich von den Sequenzen der oben beschriebenen Nucleinsäuremoleküle an einer oder mehreren Positionen unterscheiden und einen hohen Grad an Homologie zu diesen Sequenzen aufweisen. Homologie bedeutet dabei eine Sequenzidentität von mindestens 40 %, insbesondere eine Identität von mindestens 60 %, vorzugsweise über 80 % und besonders bevorzugt über 90 %. Die Abweichungen zu den oben beschriebenen Nucleinsäuremolekülen können dabei durch Deletion, Addition, Substitution, Insertion oder Rekombination entstanden sein.

Homologie bedeutet ferner, daß funktionelle und/oder strukturelle Äquivalenz zwischen den betreffenden Nucleinsäuremolekülen oder den durch sie codierten Proteinen besteht. Bei den Nucleinsäuremolekülen, die homolog zu den oben beschriebenen Molekülen sind und Derivate dieser Moleküle darstellen, handelt es sich in der Regel um Variationen dieser Moleküle, die Modifikationen darstellen, die dieselbe biologische Funktion ausüben. Es kann sich dabei sowohl um natürlicherweise auftretende Variationen handeln, beispielsweise um Sequenzen aus anderen Organismen, oder um Mutationen, wobei diese Modifikationen auf natürliche Weise aufgetreten sein können oder durch gezielte Mutagenese eingeführt wurden. Ferner kann es sich bei den Variationen um synthetisch her-

8

gestellte Sequenzen handeln. Bei den allelischen Varianten kann es sich sowohl um natürlich auftretende als auch um synthetisch hergestellte oder durch rekombinante DNA-Techniken erzeugte Varianten handeln.

Die von den verschiedenen Varianten der Nucleinsäuremoleküle codierten Proteine weisen bestimmte gemeinsame Charakteristika auf. Dazu können z.B. Enzymaktivität, Molekulargewicht, immunologische Reaktivität, Konformation etc. gehören. Weitere gemeinsame Charakteristika können physikalische Eigenschaften wie z.B. das Laufverhalten in Gelelektrophoresen, chromatographisches Verhalten, Sedimentationskoeffizienten, Löslichkeit, spektroskopische Eigenschaften, Stabilität, pH-Optimum, Temperatur-Optimum etc. darstellen. Des weiteren können natürlich die Produkte der von den Proteinen katalysierten Reaktionen gemeinsame oder ähnliche Merkmale aufweisen. Insbesondere weisen die von den Nucleinsäureseguenzen codierten Proteine Levansucrase-Aktivität auf.

Der Nachweis der enzymatischen Aktivität der Levansucrase kann beispielsweise durch den Nachweis der Bildung von Levan erfolgen (vgl. Ebskamp et al. (1994) Bio/Technology 12, 272-275). Dieser Nachweis beruht darauf, daß sich ein Protein mit einer Levansucrase-Aktivität nachweisen läßt, wenn Proteinextrakte mit Saccharose inkubiert werden und das sich bildende Levan als Polyfructan mit Fructose-spezifischen Agentien nachgewiesen wird. Es ist gleichfalls möglich, durch Shot-Gun-Expression in z.B. E. coli bei Kultivierung auf Saccharose-haltigem Medium Levan als Polymer in situ bei Verwendung von Replikaplatten nachzuweisen.

Die erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle können beliebige Nucleinsäuremoleküle sein, insbesondere DNA- oder RNA-Moleküle, beispielsweise cDNA, genomische DNA, mRNA etc. Sie können natürlich vorkommende oder durch gentechnische oder chemische Syntheseverfahren hergestellte Moleküle sein.

Erfindungsgemäß sind die Nucleinsäuremoleküle der vorliegenden Erfindung mit regulatorischen Elementen verknüpft, die

die Transkription und Translation in der Pflanzenzelle gewährleisten. Durch die Bereitstellung der erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle besteht nun die Möglichkeit, pflanzliche Zellen mittels gentechnologischer Methoden dahingehend zu verändern, daß sie eine, einen lokalen Zelltod bewirkende enzymatische Aktivität aufweisen.

Ein besonderer Vorteil der Erfindung besteht darin, daß der lokale Zelltod in Pflanzen unter Verwendung der erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle gegebenenfalls gezielt löst werden kann. Für den genannten Promotor kommt daher im Prinzip jeder in den für die Transformation gewählten Pflanzen funktionale Promotor in Betracht, der die Bedingung erfüllt, daß die von ihm regulierte Expression zu einer lokalisierten Nekrose führt und die Pflanze nicht zu großflächig zum Absterben bringt. Besonders sinnvoll erscheinen hierfür Promotoren, die spezifisch bei Befall durch Pathogene lokal induziert werden. Dabei schließt der Begriff Pathogen im Rahmen der vorliegenden Erfindung Pilze, Bakterien, Viren, Insekten sowie Nematoden ein. Solche Promotoren sind bekannt. und in der Literatur beschrieben, vgl. z.B. Martini et al. (1993) Molecular and General Genetics 236, 179-186, oder WO 94/17194. Wenn solche Promotoren nicht bekannt sind, so ist das Konzept zur Isolierung solcher Promotoren dem Fachmann bekannt. Dabei wird in einem ersten Schritt aus einem Gewebe, welches von einem bestimmten Pathogen befallen ist, die poly(a) + RNA isoliert und eine cDNA-Bank angelegt. In einem zweiten Schritt werden mit Hilfe von cDNA-Clonen, die auf poly(A) + RNA-Molekülen aus einem nicht-infizierten Gewebe basieren, aus der ersten Bank mittels Hybridisierung diejenigen Clone identifiziert, deren korrespondierende poly(A) + RNA-Moleküle lediglich bei Befall durch das Pathogen induziert werden. Anschließend werden mit Hilfe dieser so identifizierten cDNA's Promotoren isoliert, die sodann Expression der hier beschriebenen codierenden Nucleinsäuresequenzen verwendet werden können. In einer bevorzugten Ausführungsform steht die Nucleinsäuresequenz, die die den lokalen Zelltod verantwortliche enzymatische Aktivität codiert, daher unter der Kontrolle eines pathogen-induzierten Promotors. In einer besonders bevorzugten Ausgestaltung liegt die Nucleinsäuresequenz in Kombination mit dem prpl-1-Promotor aus Kartoffel vor.

Weitere bevorzugte Ausführungsformen umfassen die Kombination der für den Zelltod verantwortlichen Nucleinsäuresequenz mit in Pflanzen aktiven gewebe- oder entwicklungsspezifischen Promotoren. Besonders bevorzugt ist ein Nucleinsäuremolekül, in dem die codierende Nucleinsäuresequenz unter Kontrolle eines antheren- oder tapetumspezifischen Promotors steht.

Eine Alternative zur Erreichung des Ziels, daß die Pflanze in vielen Bereichen aufgrund der Expression der erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle einen lokalisierten aufweist, besteht darin, einen konstitutiven Promotor verwenden, diesen Promotor aber von der codierenden Sequenz der erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle durch die Insertion eines transposablen Elements (Transposon) zu trennen. Von Transposons ist bekannt, daß sie in somatischen Geweben exzisieren. Solche Exzisionen führen dazu, daß Promotor und codierende Sequenz in direkten Kontakt gebracht werden und führen somit zur Bildung der für den lokalisierten Zelltod verantwortlichen enzymatischen Aktivität. Transposons sind in der Literatur beschrieben und cloniert und stehen in reicher Auswahl zur Verfügung, wie z.B. Ac/Ds (Aktivator/Dissoziation-Transposonfamilie), En/Spm aus Mais (Enhancer/Suppressor-mutator-Transposonfamilie; vgl. Düring and Sarlinger (1986) Ann. Rev. Genet. 20, 175 für eine Übersicht).

Die Verwendung der erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle zur Erzeugung eines lokalen Zelltodes kann neben der beschriebenen Anwendung zur Erzeugung einer systemisch erworbenen Resistenz (SAR) gegenüber Pathogenen und somit zur Erzeugung von Pflanzen, die sich durch eine erhöhte Krankheitsresistenz auszeichnen, auch zur Erzeugung von männlich

sterilen Pflanzen genutzt werden. Männlich sterile Pflanzen spielen in der Pflanzenzüchtung, insbesondere in der Hybridzüchtung, eine bedeutende Rolle. Zu diesem Zweck wird die für die den Zelltod verursachende enzymatische Aktivität codierende Nucleinsäuresequenz mit einem antheren- oder tapetumspezischen Promotor gekoppelte. Beispiele für solche Promotoren werden z.B. in WO92/13956 und WO92/13957 genannt. Dies führt zum Absterben der Antheren und damit zur Unterbindung der Pollenbildung. Ein Restorer-Gen, das mit der erfindungsgemäßen Nucleinsäuresequenz gemeinsam verwendet werden kann, würde die den Zelltod bewirkende enzymatische Aktivität unterdrücken. So würde z.B. bei der Verwendung der eine Levansucrase codierenden Region die Bildung des Produkts, dies bedeutet des Levans, durch eine gleichzeitige Expression einer Levanase im Zellraum beeinflußt werden. Alternativ würde die Expression eines entsprechenden Antisense-Konstrukts die den lokalisierten Zelltod verursachende enzymatische Aktivität aufgrund einer Antisense-Suppression beeinflussen. Ebenso könnte die Expression der erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle und damit die daraus resultierende zelltötende Aktivität durch das Phänomen der Cosuppression durch das zusätzliche Einbringen von sense-Konstrukten in die Pflanzenzelle beeinflußt werden.

Des weiteren können die erfindungsgemäßen Nucleinsäuresequenzen zusammen mit Promotoren verwendet werden, die in Pflanzen durch abiotische Stimuli, wie z.B. Chemikalien, Ozon, UV-Strahlung, extreme Temperaturen, Trockenheit, Salz induziert werden. Beispiele für solche Promotoren finden sich in der Literatur, so z.B. in Williams et al. (1992) Biotechnology 10, 540.

Es besteht grundsätzlich die Möglichkeit, daß die für den lokalen Zelltod verantwortliche enzymatische Aktivität in jedem beliebigen Kompartiment der pflanzlichen Zelle lokalisiert sein kann. In einer bevorzugten Ausführungsform wird die Form des Proteins, oder eines Fragments davon gewählt,

12

die im extrazellulären Raum, d.h. im Apoplast, lokalisiert ist. In einer besonders bevorzugten Ausführungsform wird die codierende Sequenz der Levansucrase verwendet, wie sie aus Erwinia amylovora isoliert worden ist.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform enthält das erfindungsgemäße Nucleinsäuremolekül ein Terminationssignal für die Termination der Transkription und die Addition eines Poly-A-Schwanzes an das entsprechende Transkript. Derartige Terminationssignale sind bekannt und sind beliebig gegeneinander austauschbar. Ein Beispiel für eine solche Sequenz ist das Terminationssignal des Octopin-Synthase-Gens von Agrobacterium tumefaciens.

Gegebenenfalls können die Nucleinsäuresequenzen der Erfindung durch Enhancer-Sequenzen oder andere regulatorische Sequenzen ergänzt sein. Diese regulatorischen Sequenzen umfassen z.B. auch Signalsequenzen, die für den Transport des Genprodukts zu einem bestimmten Kompartiment sorgen. Vorzugsweise umfaßt ein erfindungsgemäßes Nucleinsäuremolekül eine Nucleotidsequenz, die eine die Sekretion des Proteins gewährleistende Aminosäuresequenz codiert.

Die vorliegende Erfindung betrifft ferner Vektoren, insbesondere Plasmide, Cosmide, Viren Bakteriophagen und andere in der Gentechnik gängige Vektoren, die die oben beschriebenen erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle enthalten und gegebenenfalls für den Transfer der erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle in Pflanzen bzw. Pflanzenzellen eingesetzt werden können.

Ebenso betrifft die Erfindung Wirtszellen, die mit einem erfindungsgemäßen Nucleinsäuremolekül oder Vektor gentechnisch modifiziert sind. Dieses können prokaryontische als auch eukaryontische Zellen sein. Insbesondere können es Mikroorganismen sein, wie Bakterien, Viren, Pilze, die die erfindungsgemäßen Nucleinsäuresequenzen enthalten, d.h. Mikroorganismen den den seinsauresequenzen enthalten, d.h. Mikroorganismen sein, wie Bakterien, viren, Pilze, die die erfindungsgemäßen Nucleinsäuresequenzen enthalten, d.h. Mikroorganismen sein, wie Bakterien, viren, Pilze, die die erfindungsgemäßen Nucleinsäuresequenzen enthalten, d.h. Mikroorganismen sein, wie Bakterien, viren, Pilze, die die erfindungsgemäßen Nucleinsäuresequenzen enthalten, d.h.

13

ganismen, die mit einem erfindungsgemäßen Nucleinsäuremolekül genetisch modifiziert sind. Ferner können es auch tierische Zellen sein.

Durch die Bereitstellung der erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle besteht nun die Möglichkeit, pflanzliche Zellen
mittels gentechnischer Methoden dahingehend zu verändern,
daß sie im Vergleich zu Wildtypzellen eine neue enzymatische
Aktivität aufweisen, und es als Folge davon in Pflanzen, die
derartige Zellen enthalten, zu einem lokalen Zelltod kommen
kann.

In einer bevorzugten Ausführungsform handelt es sich daher bei den erfindungsgemäßen Wirtszellen um pflanzliche Zellen, die aufgrund der Gegenwart und Expression eines zusätzlich eingeführten erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküls im Vergleich zu nicht-transformierten Zellen eine enzymatische Aktivität aufweisen, die für einen lokalen Zelltod verantwortlich ist. In einer besonders bevorzugten Ausführungsform handelt es sich um transgene pflanzliche Zellen, die eine Levansucrase exprimieren unter der Kontrolle eines pathogenspezifischen Promotors.

Das erfindungsgemäße Nucleinsäuremolekül kann dabei stabil in das Genom der Pflanzenzelle integriert sein. Alternativ kann das Nucleinsäuremolekül, das die den Zelltod bedingende enzymatische Aktivität codiert, als selbstreplizierendes System in die Zelle eingebracht werden.

Gegenstand der Erfindung sind ebenfalls transgene Pflanzen, die die oben beschriebenen erfindungsgemäßen transgenen Pflanzenzellen, in denen die Nucleinsäuremoleküle integriert in das pflanzliche Genom vorliegen, enthalten. Ebenfalls Gegenstand der Erfindung sind Pflanzen, in deren Zellen ein erfindungsgemäßes Nucleinsäuremolekül in selbstreplizierender Form vorliegt, d.h. die Pflanzenzelle enthält die fremde DNA auf einem eigenständigen Nucleinsäuremolekül.

Bei den Pflanzen, die mit den erfindungsgemäßen Nucleinsäuremolekülen transformiert sind und in denen aufgrund der Einführung eines solchen Moleküls ein für einen lokalisier-Zelltod verantwortliches Protein synthetisiert wird, kann es sich im Prinzip um jede beliebige Pflanze handeln. Vorzugsweise ist es eine monokotyle oder dikotyle Nutzpflanze. Beispiele für monokotyle Pflanzen sind die Pflanzen, die zu den Gattungen Avena (Hafer), Triticum (Weizen), Secale (Roggen), Hordeum (Gerste), Oryza (Reis), Panicum, Pennisetum, Setaria, Sorghum (Hirse), Zea (Mais) gehören. Bei den dicotylen Nutzpflanzen sind u.a. zu nennen Baumwolle, Leguminosen, wie Hülsenfrüchte und insbesondere Alfalfa, Sojabohne, Raps, Tomate, Zuckerrübe, Kartoffel, Zierpflanzen, Bäume. Weitere Nutzpflanzen können Obst (insbesondere Äpfel, Birnen, Kirschen, Weintrauben, Citrus, Ananas und Bananen), Ölpalmen, Tee-, Kakao- und Kaffeesträucher, Tabak, Sisal sowie bei Heilpflanzen Rauwolfia und Digitalis sein. Besonders bevorzugt sind die Getreide, Weizen, Roggen, Hafer, Gerste, Reis, Mais und Hirse, Zuckerrübe, Raps, Soja, Tomate und Kartoffel.

Gegenstand der Erfindung ist ferner Vermehrungsmaterial von erfindungsgemäßen Pflanzen, beispielsweise Samen, Früchte, Stecklinge, Knollen, Wurzelstöcke etc., wobei dieses Vermehrungsmaterial oben beschriebene transgene Pflanzenzellen enthält. Ebenso betrifft die vorliegende Erfindung Teile der erfindungsgemäßen Pflanzen, wie z.B. Protoplasten, Pflanzenzelle und Kalli, die erfindungsgemäße Nucleinsäuremoleküle enthalten.

Die Erfindung betrifft ebenfalls Pflanzen, die aufgrund der Expression der erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle eine im Vergleich zu Pflanzen, die die Nucleinsäuremoleküle nicht enthalten, erhöhte Salicylsäurekonzentration aufweisen. Weiter betrifft die Erfindung Pflanzen, die sich im Vergleich zu Pflanzen, die die erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle

nicht enthalten, durch eine erhöhte Krankheitsresistenz auszeichnen.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform handelt es sich um Pflanzen, die aufgrund der Expression eines Levansucrase-Gens aus E. amylovora einen lokalen Zelltod zeigen, der gegebenenfalls mit der Ausprägung einer SAR einhergeht.

Die vorliegende Erfindung betrifft ebenfalls Pflanzen, die durch die Expression eines erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküls männlich steril sind.

Weiterhin betrifft die vorliegende Erfindung ein Verfahren, mit dessen Hilfe die Erzeugung von Pflanzen, die einen lokalisierten Zelltod zeigen und die gegebenenfalls zusätzlich durch den Erwerb einer SAR gekennzeichnet sind, sowie von Pflanzen, die aufgrund des lokalisierten Zelltods männlich steril sind, möglich ist.

Zur Erzeugung solcher Pflanzen bieten sich verschiedene Methoden an. Zum einen können Pflanzen bzw. Pflanzenzellen mit Hilfe hermömmlicher gentechnologischer Transformationsmethoden derart verändert werden, daß ein erfindungsgemäßes das pflanzliche Genom Nucleinsäuremolekül in integriert wird, d.h. daß stabile Transformanten erzeugt werden. anderen kann ein erfindungsgemäßes Nucleinsäuremolekül, dessen Expression in der Pflanzenzelle das Absterben der Zelle bewirkt, in der Pflanzenzelle bzw. der Pflanze als selbstreplizierendes System enthalten sein. So können die erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle z.B. in einem Virus enthalten sein, mit dem die Pflanze bzw. Pflanzenzelle in Kontakt kommt.

Erfindungsgemäß werden Pflanzenzellen, die aufgrund der Expression eines erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküls eine einen Zelltod bewirkende Aktivität besitzen, durch ein Verfahren hergestellt, das folgende Schritte umfaßt:

quenzen umfaßt:

(a) Herstellung einer Expressionskassette, die folgende Se-

16

- einen Promotor, der die Transkription in pflanzlichen Zellen gewährleistet;
- mindestens eine Nucleinsäuresequenz, die ein Protein oder ein Fragment davon codiert, dessen enzymatische Aktivität in Pflanzen einen lokalisierten Zelltod bewirkt, wobei die Nucleinsäuresequenz in sense-Orientierung an das 3'-Ende des Promotors gekoppelt ist; und
- gegebenenfalls ein Terminationssignal für die Termination der Transkription und die Addition eines poly-A-Schwanzes an das entsprechende Transkript, das an das 3'-Ende der codierenden Region gekoppelt ist.
- (b) Transformation pflanzlicher Zellen mit der in Schritt (a) hergestellten Expressionskassette.
- (c) Regeneration transgener Pflanzen und gegebenenfalls die Vermehrung der Pflanzen.

Alternativ können ein oder mehrere erfindungsgemäße Nucleinsäuremoleküle als selbstreplizierendes System in die Pflanzenzelle bzw. Pflanze eingebracht werden.

Gegenstand der Erfindung ist ebenfalls die Verwendung eines pathogen-spezifischen Promotors, insbesondere des prpl-1-Promotors zur Erzeugung von Pflanzen, bei denen ein lokalisierter Zelltod auftritt und/oder die mindestens ein für eine systemisch erworbene Resistenz typisches Merkmal und/oder erhöhte Krankheitsresistenz im Vergleich zu Wildtyp-Pflanzen aufweisen.

Die Erfindung betrifft ebenfalls die Verwendung von Nucleinsäuresequenzen, die ein Protein mit der enzymatischen Aktivität einer Levansucrase codieren, zur Erzeugung von Pflan-

17

zen, die sich durch einen lokalisierten Zelltod auszeichnen, sowie zur Erzeugung eines lokalisierten Zelltods in Pflanzen. Ebenso betrifft die vorliegende Erfindung die Verwendung derartiger Nucleinsäuresequenzen zur Erzeugung einer systemisch erworbenen Resistenz bei Pflanzen, zur Erhöhung der Salicylsäure-Konzentration in Pflanzen und/oder zur Erhöhung der Krankheitsresistenz in Pflanzen.

Weiter betrifft die Erfindung die Verwendung eines Proteins mit der enzymatischen Aktivität einer Levansucrase, um in Pflanzen einen lokalisierten Zelltod hervorzurufen.

Die vorliegende Erfindung betrifft ebenso die Verwendung von Nucleinsäuresequenzen, die Proteine mit der biologischen Aktivität einer Levansucrase codieren, oder solcher Proteine, zur Erzeugung von männlicher Sterilität in Pflanzen.

Die vorliegende Erfindung umfaßt somit jede mögliche Form des Einsatzes der erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle, deren Expression in Pflanzen das Absterben von Zellen bewirkt, sowie des Einsatzes der erfindungsgemäßen Proteine oder Fragmente davon, deren enzymatische Aktivität den Zelltod herbeiführen.

Zur Vorbereitung der Einführung fremder Gene in höhere Pflanzen stehen eine große Anzahl von Clonierungsvektoren zur Verfügung, die ein Replikationssignal for E. coli und ein Markergen zur Selektion transformierter Bakterienzellen enthalten. Beispiele für derartige Vektoren sind pBR322, pUC-Serien, M13mp-Serien, paCYC184 usw. Die gewünschte Sequenz kann an einer passenden Restriktionsschnittstelle in den Vektor eingeführt werden. Das erhaltene Plasmid wird für die Transformation von E. coli-Zellen verwendet. Transformierte E. coli-Zellen werden in einem geeigneten Medium gezüchtet und anschließend geerntet und lysiert. Das Plasmid wird wiedergewonnen. Als Analysemethode zur Charakterisierung der gewonnenen Plasmid-DNA werden im allgemeinen Re-

18

striktionsanalysen, Gelelektrophoresen und weitere biochemisch-molekularbiologische Methoden eingesetzt. Nach jeder
Manipulation kann die Plasmid-DNA gespalten werden und die
gewonnenen DNA-Fragmente können mit anderen DNA-Sequenzen
verknüpft werden. Jede Plasmid-DNA-Sequenz kann in den gleichen oder anderen Plasmiden cloniert werden.

Für die Einführung von DNA in eine pflanzliche Wirtszelle stehen eine Vielzahl bekannter Techniken zur Verfügung, wobei der Fachmann die jeweils geeignete Methode ohne Schwierigkeiten ermitteln kann. Diese Techniken umfassen Transformation pflanzlicher Zellen mit T-DNA unter Verwendung von Agrobacterium tumefaciens oder Agrobacterium rhizogenes als Transformationsmittel, die Fusion von Protoplasten, den direkten Gentransfer isolierter DNA in Protoplasten, die Elektroporation von DNA, die Einbringung von DNA mittels der biolistischen Methode sowie weitere Möglichkeiten. Alternativ können die erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle, z.B. über eine virale Infektion, als selbstreplizierendes System ohne nachfolgende Integration in das pflanzliche Genom in die Zellen eingebracht werden.

Bei der Injektion und Elektroporation von DNA in Pflanzenzellen werden per se keine speziellen Anforderungen an die verwendeten Plasmide gestellt. Ähnliches gilt für den direkten Gentransfer. Es können einfache Plasmide wie z.B. pUC-Derivate verwendet werden. Sollen aber aus derartig transformierten Zellen ganze Pflanzen regeneriert werden, so sollte ein selektierbares Markergen anwesend sein. Dem Fachmann sind die gängigen Selektionsmarker bekannt und es stellt für ihn kein Problem dar, einen geeigneten Marker auszuwählen.

Je nach Einführungsmethode eines Gens in die Pflanzenzelle können gebebenenfalls weitere DNA-Sequenzen erforderlich sein. Werden z.B. für die Transformation der Pflanzenzelle das Ti- oder Ri-Plasmid verwendet, so sollte mindestens die rechte Begrenzung, häufig jedoch die rechte und linke Begrenzung der im Ti- und Ri-Plasmid enthaltenen T-DNA als

19

Flankenbereich mit den einzuführenden Genen verbunden werden.

Transformation Agrobakterien verwendet, Werden für die sollte die einzuführende DNA in spezielle Plasmide cloniert werden, und zwar entweder in einen intermediären oder in einen binären Vektor. Die intermediären Vektoren können aufgrund von Sequenzen, die homolog zu Sequenzen in der T-DNA sind, durch homologe Rekombination in das Ti- oder Ri-Plasder Agrobakterien integriert werden. Dieses außerdem die für den Transfer der T-DNA notwendige vir-Region. Intermediäre Vektoren können nicht in Agrobakterien replizieren. Mittels eines Helferplasmids kann der intermediäre Vektor auf Agrobacterium tumefaciens übertragen werden (Konjugation). Binäre Vektoren können sowohl in E. coli als auch in Agrobakterien replizieren. Sie enthalten ein Selektionsmarker-Gen und einen Linker oder Polylinker, welche von der rechten und linken T-DNA-Grenzregion eingerahmt werden. Sie können direkt in die Agrobakterien transformiert werden (Holsters et al. (1978) Molecular and General Genetics 163, 181-187). Das als Wirtszelle dienende Agrobacterium sollte ein Plasmid, das eine <u>vir</u>-Region trägt, enthalten. Die <u>vir</u>-Region ist in der Regel für den Transfer der T-DNA in die Pflanzenzelle notwendig. Zusätzliche T-DNA kann vorhanden sein.

Das derartig transformierte Agrobakterium wird zur Transformation von Pflanzenzellen verwendet.

Die Verwendung von T-DNA für die Transformation von Pflanzenzellen ist intensiv untersucht und ausreichend in EP 120 515; Hoekema in: The Binary Plant Vector System, Offsetdrokkerij Kanters B.V., Alblasserdam (1985) Chapter V; Fraley et al. (1993) Crit. Rev. Plant. Sci. 4, 1-46 und An et al. (1985) EMBO J. 4, 277-287 beschrieben worden.

Für den Transfer der DNA in die Pflanzenzelle können Pflanzenexplantate zweckmäßigerweise mit Agrobacterium tumefaciens oder Agrobacterium rhizogenes kultiviert werden. Aus dem infizierten Pflanzenmaterial (z.B. Blattstücke, Stengel-

segmente, Wurzeln, aber auch Protoplasten oder Suspensions-kultivierte Pflanzenzellen) können dann in einem geeigneten Medium, welches Antibiotika oder Biozide zur Selektion transformierter Zellen enthalten kann, wieder ganze Pflanzen regeneriert werden. Die Regeneration der Pflanzen erfolgt nach üblichen Regenerationsmethoden unter Verwendung bekannter Nährmedien. Die so erhaltenen Pflanzen können dann auf Anwesenheit der eingeführten DNA untersucht werden. Andere Möglichkeiten der Einführung fremder DNA unter Verwendung des biolostischen Verfahrens oder durch Protoplasten-Transformation sind bekannt (vgl. z.B. Willmitzer L. (1993) Transgenic Plants, in: Biotechnology, A Multi-Volume Comprehensive Treatise (H.J. Rehm, G. Reed, A. Pühler, P. Stadler, eds., Vol. 2, 627-659, V.C.H. Weinheim - New York - Basel - Cambridge).

Während die Transformation dikotyler Pflanzen über Ti-Plasmid-Vektorsysteme mit Hilfe von Agrobacterium tumefaciens wohl etabliert ist, weisen neuere Arbeiten darauf hin, daß auch monokotyle Pflanzen der Agrobakterien-vermittelten Transformation mittels Agrobacterium-basierender Vektoren sehr wohl zugänglich sind (Chan et al. (1993) Plant Mol. Biol. 22, 491-506; Hiei et al. (1994) Plant J. 6, 271-282; Deng et al. (1990) Science in China 33, 28-34; Wilmink et al. (1992) Plant Cell Reports 11, 76-80; May et al. (1995) Bio/Technology 13, 486-492; Conner und Domiss (1992) Int. J. Plant Sci. 153, 550-555; Ritchie et al. (1993) Transgenic Res. 2, 252-265).

Alternative Systeme zur Tansformation von monokotylen Pflanzen sind die Transformationen mittels des biolistischen Ansatzes (Wan und Lemaux (1994) Plant Physiol. 104, 37-48; Vasil et al. (1993) Bio/Technology 11, 1553-1558; Ritala et al. (1994) Plant Mol. Biol. 24, 317-325; Spencer et al. (1990) Theor. Appl. Genet. 79, 625-631), die Protoplasten-Transformation, die Elektroporation von partiell permeabilisierten Zellen, die Einbringung von DNA mittels Glasfasern. Spezifisch die Transformation von Mais wird in der Literatur verschiedentlich beschrieben (vgl. z.B. WO 95/06128; EP 0

513 849; EP 0 465 875; Fromm et al. (1990) Biotechnology 8, 833-844; Gordon-Kamm et al. (1990) Plant Cell 2, 603-618; Koziel et al. (1993) Biotechnology 11, 194-200). In EP 292 435 wird ein Verfahren beschrieben, mit Hilfe dessen, ausgehend von einem schleimlosen, weichen (friable) granulösen fertile Mais-Kallus, Pflanzen erhalten werden können. Shillito et al. ((1989) Bio/Technology 7; 581) haben in diesem Zusammenhang beobachtet, daß es ferner für die Regenerierbarkeit zu fertilen Pflanzen notwendig ist, von Kallus-Suspensionskulturen auszugehen, aus denen eine sich teilende Protoplastenkultur mit der Fähigkeit zu Pflanzen zu regenerieren, herstellbar ist. Nach einer in vitro Kultivierungszeit von sieben bis acht Monaten erhalten Shillito et al. Pflanzen mit lebensfähigen Nachkommen, die jedoch Abnormalitäten in der Morphologie und der Reproduktion aufweisen. Prioli und Söndahl ((1989) Bio/Technology 7, 589) beschreiben die Regeneration und die Gewinnung fertiler Pflanzen aus Mais-Protoplasten, der Cateto-Mais-Inzuchtlinie Cat 100-1. Die Autoren vermuten, daß die Protoplasten-Regeneration zu fertilen Pflanzen von einer Anzahl verschiedener Faktoren, wie z.B. vom Genotyp, vom physiologischen Zustand der Donor-Zellen und von den Kultivierungsbedingungen, abhängig ist. Auch die erfolgreiche Transformation anderer Getreidearten wurde bereits beschrieben, z.B. für Gerste (Wan und Lemaux, a.a.O.; Ritala et al., a.a.O.) und für Weizen (Nehra et al. (1994) Plant J. 5, 285-297).

Ist die eingeführte DNA einmal im Genom der Pflanzenzelle integriert, so ist sie dort in der Regel stabil und bleibt auch in den Nachkommen der ursprünglich transformierten Zelle erhalten. Sie enthält normalerweise einen Selektionsmarker, der den transformierten Pflanzenzellen Resistenz gegenüber einem Biozid oder einem Antibiotikum wie Kanamycin, G418, Bleomycin, Hygromycin, Methotrexat, Glyphosat, Streptomycin, Sulfonyl-Harnstoff, Gentamycin oder Phosphinotricin u.a. vermittelt. Der individuell gewählte Marker sollte daher die Selektion transformierter Zellen gegenüber Zellen, denen die eingeführte DNA fehlt, gestatten.

22

Die transformierten Zellen wachsen innerhalb der Pflanze in der üblichen Weise (siehe auch McCormick et al. (1986) Plant Cell Reports 5, 81-84). Die resultierenden Pflanzen können normal angezogen werden und mit Pflanzen, die die gleiche transformierte Erbanlage oder andere Erbanlagen besitzen, gekreuzt werden. Die daraus entstehenden hybriden Individuen haben die entsprechenden phänotypischen Eigenschaften. Von den Pflanzen können Samen gewonnen werden.

Es sollten zwei oder mehrere Generationen angezogen werden, um sicherzustellen, daß das phänotypische Merkmal stabil beibehalten und vererbt wird. Auch sollten Samen geerntet werden, um sicherzustellen, daß der entsprechende Phänotyp oder andere Eigenarten erhalten geblieben sind.

Ebenso können nach üblichen Methoden transgene Linien bestimmt werden, die für die neuen Nucleinsäuremoleküle homozygot sind und ihr phänotypisches Verhalten hinsichtlich eines lokalisierten Zelltods und/oder einer SAR und/oder erhöhter Krankheitsresistenz und/oder männlicher Sterilität untersucht und mit dem von hemizygoten Linien verglichen werden.

- Figur 1: zeigt das Auftreten nekrotischer Bereiche in transgenen Tabakpflanzen, die mit dem Konstrukt Lss8 transformiert worden sind.
- Figur 2: zeigt die Menge an Salicylsäure in transgenen Tabakpflanzen (1-5) im Vergleich zu Wildtyp-Pflanzen (6-7).
- Figur 3: zeigt das Ergebnis eines Northern Blot-Experiments. Zur Analyse wurden jeweils 30 μg poly(A)<sup>+</sup>-mRNA aus verschiedenen transgenen Tabakpflanzen (Spur 1-5) und zwei nicht-transformierten Tabakpflanzen (Spur 6-7) verwendet. Als Sonde wurde eine cDNA des PR-1-1-Gens verwendet.

Die nachfolgenden Beispiele dienen der Erläuterung der Erfindung.

In den Beispielen werden die folgenden Methoden verwendet:

1. Clonierungsverfahren:

Für die Clonierung in E. coli wurde der Vektor pBluescript II SK (Stratagene) verwendet.

2. Bakterienstämme:

Für den Bluescript-Vektor und die Lss8-Konstrukte wurde der E. coli-Stamm DH5alpha (Bethesda Research Laboratories, Gaithersburgh, USA) verwendet.

3. Transformation von Kartoffeln:

Zehn kleine, mit dem Skalpell verwundete Blätter einer Kartoffelsterilkultur (Solanum tuberosum L. cv. Desirée) wurden in 10 ml MS-Medium (Murashige und Skoog (1962) Physiol. Plant. 15, 473) mit 2 % Saccharose gelegt, welches 50 µl einer unter Selektion gewachsenen Agrobacterium tumefaciens-Übernachtkultur enthielt. Nach 3-5minütigem, leichtem Schütteln erfolgte eine weitere Inkubation für zwei Tage im Dunkeln. Daraufhin wurden die Blätter zur Kallus-Induktion auf MS-Medium mit Glucose, 5 mg/l Naphthylessigsäure, 0,2 mg/l Benzylaminopurin, 250 mg/l Claforan, 50 mg/l Kanamycin und 0,8 % Bacto-Agar gelegt. Nach einwöchiger Inkubation bei 25°C und 3000 Lux wurden die Blätter zur Sproßinduktion auf MS-Medium mit 1,6 % Glucose, 1,4 mg/l Zeatinribose, 20  $\mu q/l$  Naphthylessigsäure, 20  $\mu q/l$  Giberellinsäure, mg/l Claforan, 50 mg/l Kanamycin und 0,8 % Bacto-Agar gelegt.

4. Transformation von Tabakpflanzen und Regeneration intakter Pflanzen:

Eine Übernachtkultur des entsprechenden Agrobacterium tumefaciens-Clons wurde für drei Minuten bei 6500 rpm

abzentrifugiert, und die Bakterien wurden in YEB-Medium Tabaksterilkultur resuspendiert. Tabakblätter einer (Nicotiana Tabacum cv. Samsun NN) wurden in kleine, ca. 1 cm² große Stücke zerschnitten und in der Bakteriensuspension gebadet. Die Blattstücke wurden anschließend auf MS-Medium (0,7 % Agar) gelegt und zwei Tage im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden die Blattstücke Sproßinduktion auf MS-Medium (0,7 % Agar) mit 1,6 % Glucose, 1 mg/l 6-Benzylaminopurin, 0,2 mg/l Naphthylessigsäure, 500 mg/l Claforan und 50 mg/l Kanamycin gelegt. Das Medium wurde alle sieben bis 10 Tage gewechselt. Wenn sich Sprosse entwickelt hatten, wurden die Blattstücke in Glasgefäße, die dasselbe Medium enthielten, überführt. Entstehende Sprosse wurden abgeschnitten und auf MS-Medium mit 2 % Saccharose und 250 mg/l Claforan gegeben und aus ihnen ganze Pflanzen regeneriert.

5. RNA-Extraktion und Northern Blot-Experimente: RNA wurde aus gefrorenem Pflanzenmaterial isoliert, wie beschrieben in Logemann et al. (1987) Anal. Biochem. 163, 21-26. Die RNA wurde in 40 % Formamid denaturiert. Anschließend wurde die RNA gelelektrophoretisch auf Formaldehyd/Agarose-Gelen aufgetrennt und nach dem Gellauf auf Nylonmembranen (Hybond N; Amersham, UK) geblottet. Die Hybridisierung gegen eine radioaktiv-markierte DNA-Sonde erfolgte nach Standardmethoden (z.B. Sambrook et al. a.a.O.).

# 6. Pflanzenhaltung:

Kartoffelpflanzen (Solanum tuberosum) wurden im Gewächshaus bei 60 % Luftfeuchtigkeit und 22°C für 16 Stunden im Licht und 15°C für 8 Stunden in Dunkelheit gehalten. Tabakpflanzen (Nicotiana tabacum) wurden im Gewächshaus bei 60 % Luftfeuchtigkeit und 25°C für 14 Stunden im Licht und 20°C für 10 Stunden in Dunkelheit gehalten.

25

7. Bestimmung von Salicylsäuregehalten: Zur Bestimmung des Gehaltes an Salicylsäure wurden die Methoden, wie bei Yalpani et al. (1991) The Plant Cell 3, 809-818 und Gaffney et al. (1993) Science 261, 754-756 beschrieben, eingesetzt.

### Beispiel 1

Konstruktion eines chimären Gens bestehend aus der codierenden Region des Levansucrase-Gens aus Erwinia amylovora und einer verkürzten Promotorregion des prpl-1-Gens aus Solanum tuberosum

Zunächst wurde mit Hilfe der Restriktionsenzyme EcoRI und XbaI ein Fragment des prpl-1-Promotors, das die Nucleotide +31 bis -402 umfaßt, aus dem Plasmid pBS42-1 (Martini et al. (1993) Mol. Gen. Genetics 236, 179-186) herausgeschnitten. Dieser EcoRI-XbaI-Promotorfragment wurde anschließend in den Vektor BINAR (Höfgen und Willmitzer (1992) Plant Science 87, 45-54) ligiert, wobei aus dem Vektor BINAR durch Verwendung der gleichen Enzyme der CaMV 35S-Promotor herausgeschnitten wurde. Der entstandene binäre Vektor enthält somit die prpl-1-Promotorregion und das Terminationssignal des Octopinsynthase-Gens (OCS) getrennt durch Restriktionsschnittstellen des pUC18-Polylinkers, der das Einfügen codierender Regionen und somit die Konstruktion entsprechender Expressionskassetten erlaubt. Anschließend wurde die codierende Region der Levansucrase mit Hilfe der Restriktionsenzyme XbaI und SalI aus dem Vektor pEa-LSK5 (Geier und Geider (1993) Physiol. Mol. Plant Pathology 42, 387-404) herausgeschnitten und in den analog geschnittenen, das prpl-1-Promotorfragment enthaltenden Vektor eingesetzt. Dieser als Lss8 bezeichnete Vektor wurde sodann in Agrobacterium tumefaciens transformiert und zur Transformation von Tabakpflanzen und Kartoffelpflanzen eingesetzt.

### Beispiel 2

Analyse transgener Tabak- und Kartoffelpflanzen, die den Vektor Lss8 enthalten

Transgene Tabak- und Kartoffelpflanzen wurden wie oben beschrieben transformiert, selektioniert und regeneriert. Nach Bewurzelung in Sterilkultur wurden ca. 50 unabhängige Transformanten im Gewächshaus in Erde überführt. 6 bis 8 Linien, die einen durch das Auftreten von nekrotischen Flecken eindeutig gekennzeichneten Phänotyp aufwiesen, konnten identifiziert werden (siehe Figur 1). Die Analyse dieser nekrotischen Bereiche auf das Vorhandensein von Levan, nach der oben beschriebenen Methode, erbrachte eindeutig den Nachweis von Levan. Diese Pflanzen, die Aufgrund der Expression des chimären Genkonstrukts pLSS8 einen lokalisierten Zelltod aufwiesen, wurden sodann im Gewächshaus weiteren Analysen unterzogen.

# Beispiel 3

### Bestimmung des Salicylsäuregehalts

Der Salicylsäuregehalt verschiedener Transformanten wurde nach den oben angegebenen Methoden bestimmt. Wie aus Figur 2 ersichtlich ist, weisen die transgenen Tabakpflanzen, die sich durch einen lokalisierten Zelltod auszeichnen, eine um einen Faktor 2-8 höhere Salicylsäuremenge im Vergleich zu Wildtyp-Pflanzen auf.

# Beispiel 4

# Analyse der Expression von typischen PR-Proteinen

Die systemisch erworbene Resistenz (SAR) ist durch die koordinierte Expression mehrerer Gene gekennzeichnet (Ward et al. (1991) The Plant Cell 3, 1085-1094). Zu den Genprodukten

27

dieser sogenannten SAR-Gene gehören die PR-Proteine (Pathogenesis-related proteins) (vgl. Van Loon (1985) Plant Mol. Biol. 4, 111-116). Da ein Zusammenhang zwischen der Expression der PR-Proteine und der Entstehung der SAR als gesichert gilt, kann die Expression typischer PR-Proteine als Indiz für die Entstehung bzw. das Vorhandensein einer SAR herangezogen werden. Die Expression von PR-Proteinen in Pflanzen, die das chimäre Lss8-Gen exprimieren, wurde mittels Northern Blot-Analyse untersucht. Wie in Figur 3 zu erkennen ist, läßt sich sowohl in grünen als auch in den bereits nekrotische Flecken aufweisenden Bereichen der Tabakpflanzen, die Expression des homologen PR1-1-Gens nachweisen, während dies in nicht-transformierten Kontrollpflanzen nicht der Fall ist.

# Patentansprüche

- 1. Nucleinsäuremolekül, bestehend aus den folgenden Bestandteilen, die in 5'-3'-Orientierung miteinander verknüpft sind:
  - (a) einem in Pflanzen funktionsfähigen Promotor ausgewählt aus:
    - (i) einem pathogen-induzierten Promotor, oder
    - (ii) einem in Pflanzen konstitutiv aktiven Promotor in Kombination mit einem transposablen Element, wobei das transposable Element den Promotor von der zu transkribierenden Nucleinsäuresequenz trennt; und
  - (b) mindestens einer Nucleinsäuresequenz, die ein Protein mit der enzymatischen Aktivität einer Levansucrase codiert.
- 2. Nucleinsäuremolekül nach Anspruch 1, wobei der Promotor der prpl-1-Promotor aus Solanum tuberosum ist.
- 3. Nucleinsäuremolekül nach Anspruch 1 oder 2, wobei die Nucleinsäuresequenz eine Levansucrase aus Erwinia amylovora codiert.
- 4. Nucleinsäuremolekül nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei die Nucleinsäuresequenz eine Sequenz umfaßt, die die Sekretion der Levansucrase gewährleistet.
- 5. Nucleinsäuremolekül nach einem der Ansprüche 1 bis 4, das weiterhin ein Terminationssignal für die Termination der Transkription und die Addition eines poly-A-Schwanzes an das entsprechende Transkript enthält, wobei dieses hinter der unter (b) genannten Nucleinsäuresequenz angeordnet ist.

6. Nucleinsäuremolekül nach Anspruch 5, wobei das Terminationssignal jenes des Octopin-Synthase-Gens aus Agrobacterium tumefaciens ist.

29

- 7. Nucleinsäuremolekül nach einem der Ansprüche 1 bis 5, das zusätzliche Enhancer-Sequenzen enthält.
- Vektor enthaltend ein Nucleinsäuremolekül nach einem der Ansprüche 1 bis 7.
- 9. Wirtszelle enthaltend ein Nucleinsäuremolekül nach einem der Ansprüche 1 bis 7 oder einen Vektor nach Anspruch 8.
- 10. Transgene Pflanzenzelle, die genetisch modifiziert ist mit einem Nucleinsäuremolekül nach einem der Ansprüche 1 bis 7 oder mit einem Vektor nach Anspruch 8.
- 11. Pflanze enthaltend Pflanzenzellen nach Anspruch 10.
- 12. Pflanze nach Anspruch 11, die mindestens ein für eine systemisch erworbene Resistenz typisches Phänomen ausprägt.
- 13. Pflanze nach Anspruch 11 oder 12, die eine im Vergleich zu nicht transformierten Pflanzen erhöhte Salicylsäure-Konzentration aufweist.
- 14. Pflanze nach einem der Ansprüche 11 bis 13, die im Vergleich zu nicht-transformierten Pflanzen eine erhöhte Krankheitsresistenz aufweisen.
- 15. Verwendung einer Nucleinsäuresequenz, die ein Polypeptid mit der enzymatischen Aktivität einer Levansucrase codiert, zur Erzeugung eines lokalisierten Zelltods bei Pflanzen.

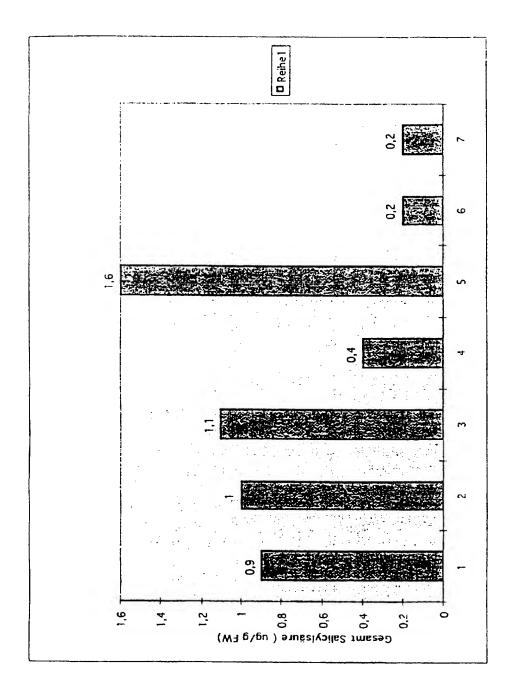
30

- 16. Verwendung einer Nucleinsäuresequenz, die ein Polypeptid mit der enzymatischen Aktivität einer Levansucrase codiert, zur Erzeugung einer systemisch erworbenen Resistenz bei Pflanzen.
- 17. Verwendung einer Nucleinsäuresequenz, die ein Polypeptid mit der enzymatischen Aktivität einer Levansucrase codiert, zur Erhöhung der Salicylsäure-Konzentration in Pflanzen.
- 18. Verwendung einer Nucleinsäuresequenz, die ein Polypeptid mit der enzymatischen Aktivität einer Levansucrase codiert, zur Erzeugung von Pflanzen mit erhöhter Krankheitsresistenz.

1/3



Fig. 1



Figur

3/3

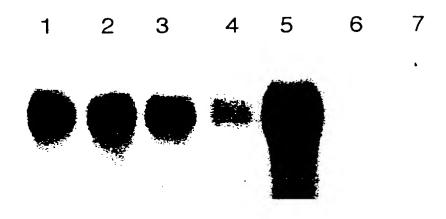


Fig. 3

BNSDOCID: <WO\_\_\_\_\_9745547A2\_I\_>

THIS PAGE BLANK (USPTO)

PCT WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM Internationales Büro
INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation 6:

C12N 15/82, 9/10, 15/54, A01H 5/00

(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 97/45547

(43) Internationales Veröffentlichungsdatum:

4. Dezember 1997 (04.12.97)

(21) Internationales Aktenzeichen:

PCT/EP97/02749

A3

(22) Internationales Anmeldedatum:

27. Mai 1997 (27.05.97)

(30) Prioritätsdaten:

196 21 572.2

29. Mai 1996 (29.05.96)

DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): MAX-PLANCK-GESELLSCHAFT ZUR FÖRDERUNG DER WISSENSCHAFTEN E.V. [DE/DE]; Berlin (DE).

(72) Erfinder; und

- (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): WILLMITZER, Lothar [DE/DE]; Am Kleinen Wannsee 34, D-14104 Berlin (DE). MÜLLER-RÖBER, Bernd [DE/DE]; Siemensstrasse 71, D-12247 Berlin (DE).
- (74) Anwalt: VOSSIUS & PARTNER; Postfach 86 07 67, D-81634 München (DE).

(81) Bestimmungsstaaten: AU, CA, CN, IL, JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).

Veröffentlicht

Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.

(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen Recherchen-15. Januar 1998 (15.01.98) berichts:

(54) Title: LOCALISED CELL DEATH IN PLANTS

(54) Bezeichnung: LOKALISIERTER ZELLTOD IN PFLANZEN

(57) Abstract

The invention relates to nucleic acid molecules for production of localised cell death in plants, and vectors containing said nucleic acid molecules. It also relates to plant cells and plants which are genetically modified by said nucleic acid molecules.

(57) Zusammenfassung

Es werden Nucleinsäuremoleküle zur Erzeugung eines lokalisierten Zelltods in Pflanzen beschrieben, ebenso wie Vektoren enthaltend derartige Nucleinsäuremoleküle, sowie Pflanzenzellen und Pflanzen, die mit derartigen Nucleinsäuremolekülen genetisch modifiziert sind.

BNSDOCID: <WO\_\_\_\_ 9745547A3 I >

# LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowskei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
ΑU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland		Republik Mazedonien	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungam	ML	Mali	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	1E	Irland	MN	Mongolei	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MR	Mauretanien	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MW	Malawi	US	Vereinigte Staaten von
CA	Kanada	IT	Italien	MX	Mexiko	_	Amerika
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NE	Niger	UZ	Ushekistan
CG	Kongo	KE	Kenia	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik	NZ	Neuseeland	zw	Zimbabwe
CM	Kamerun		Korea	PL	Polen		
CN	China	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CU	Kuba	KZ	Kasachstan	RO	Rumanien		
CZ	Tschechische Republik	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
DE	Deutschland	Li	Liechtenstein	SD	Sudan		
DK	Dānemark	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
EE	Estland	LR	Liberia	SG	Singapur		

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inte ional Application No PCT/EP 97/02749

IPC 6	FICATION OF SUBJECT MATTER C12N15/82 C12N9/10 C12N1	5/54 A01H5/00	
• • • • • • • • • • •	o international Patent Classification (IPC) or to both national clas	evination and IPC	
	SEARCHED		
	soumentation searched (classification system followed by classification sy	ication symbols)	
IPC 6	CIZN		
Documentat	tion searched other than minimum documentation to the extent the	nat such documents are included in the fields sea	rched
Documental	BEAT SEA CHECK WILLIAM THAT THE THE SEA CHECK OF SEA CHECK OF		
Electronic d	ata base consulted during the international search (name of dat	a base and, where practical, search terms used)	
C. DOCUM	ENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the	relevant passages	Relevant to claim No.
Y	DE 42 27 061 A (INST GENBIOLOG	ISCHE	1-5, 8-11,15,
	FORSCHUNG) 17 February 1994 cited in the application		16,18
	see the whole document		<b>,-</b> -
v	G. GEIER AND K. GEIDER: "Char	anctonization	1,3-5,
Y	and influence on virulence of	8-11,15,	
	levansucrase gene from the fir	16,18	
	pathogen Erwinia amylovora"		
	PHYSIOLOGICAL AND MOLECULAR PL		
	PATHOLOGY, vol. 42, 1993, LONDON, GB,		
	pages 387-404, XP002044933		
	cited in the application		
	see pages 392-393 and the las from page 400.		
	see the whole document		
		-/	
			<u></u>
X Fun	ther documents are listed in the continuation of box C.	X Patent family members are listed	и алиех.
* Special or	stegories of cited documents :	"T" later document published after the inte or priority date and not in conflict with	rnational filing date the application but
'A' docum	ent defining the general state of the art which is not dered to be of particular relevance	cited to understand the principle or th	eory underlying the
	document but published on or after the international	"X" document of particular relevance; the coannot be considered novel or canno	laimed invention
"L" docum	ent which may throw doubts on priority claim(s) or is cited to establish the publication date of snother	involve an inventive step when the do "Y" document of particular relevance; the	oument is taken alone
citatio	on or other special reason (as specified) ment referring to an oral disclosure, use, exhibition or	cannot be considered to involve an in document is combined with one or m	ventive step when the
other	means sent published prior to the international filing date but	ments, such combination being obvio in the art.	us to a person skilled
	than the priority date claimed	"&" document member of the same patent	
Date of the	actual completion of the international search	Date of mailing of the international sec	arch report
] 3	3 November 1997	26 -11- 1997	
Name and	mailing address of the ISA	Authorized officer	<u> </u>
	European Patent Office, P.B. 5818 Patentiaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk		
İ	Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Mateo Rosell, A.I	٧.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

1

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Into Ional Application No
PCT/EP 97/02749

	PCT/EP 97/02749		
ation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT			
Citation of document, with indication, where appropriate, of the mlevant passages	Relevant to claim No.		
N. MARTINI ET AL.,: "Promoter sequences of a potato pathogenesis-related gene mediate transcriptional activation selectively upon fungal infection" MOLECULAR & GENERAL GENETICS, vol. 236, 1993, BERLIN, DE, pages 179-186, XP002044934 cited in the application see the whole document	2,8-11		
EP 0 255 378 A (CALGENE INC) 3 February 1988 see the whole document, in particular see page 3, line 27-31 - line 52-56 see page 7, line 27-65 - page 9, line 10	1,5-7		
R. HOFGEN AND L. WILLMITZER: "Transgenic potato plants depleted for the major tuber protein patatin via expression of antisense RNA" PLANT SCIENCE, vol. 87, 1992, AMSTERDAM, NL, pages 45-54, XP002044935 cited in the application see the whole document	1,8-11		
WO 95 31564 A (THE GATSBY CHARITABLE FOUNDATION ) 23 November 1995 cited in the application see the whole document, in particular pages 11-15	1,10-12, 16,18		
EP 0 392 225 A (CIBA GEIGY AG) 17 October 1990 see the whole document	1-12,14, 16,18		
	N. MARTINI ET AL.,: "Promoter sequences of a potato pathogenesis-related gene mediate transcriptional activation selectively upon fungal infection" MOLECULAR & GENERAL GENETICS, vol. 236, 1993, BERLIN, DE, pages 179-186, XP002044934 cited in the application see the whole document  EP 0 255 378 A (CALGENE INC) 3 February 1988 see the whole document, in particular see page 3, line 27-31 - line 52-56 see page 7, line 27-65 - page 9, line 10  R. HOFGEN AND L. WILLMITZER: "Transgenic potato plants depleted for the major tuber protein patatin via expression of antisense RNA" PLANT SCIENCE, vol. 87, 1992, AMSTERDAM, NL, pages 45-54, XP002044935 cited in the application see the whole document  WO 95 31564 A (THE GATSBY CHARITABLE FOUNDATION) 23 November 1995 cited in the application see the whole document, in particular pages 11-15  EP 0 392 225 A (CIBA GEIGY AG) 17 October 1990		

1

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Inte ional Application No
PCT/EP 97/02749

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
DE 4227061 A	17-02-94	AU 682472 B AU 4946893 A CA 2142308 A WO 9404692 A EP 0663956 A	09-10-97 15-03-94 03-03-94 03-03-94 26-07-95
		НU 70977 A JP 8500015 T	28-11-95 09-01-96
EP 0255378 A	03-02-88	AU 612326 B AU 7630287 A AU 609724 B AU 7630387 A DE 3789582 D EP 0255377 A ES 2054676 T IN 170125 A JP 63119680 A JP 63112987 A US 5110728 A US 5420034 A US 5315001 A	11-07-91 04-02-88 09-05-91 04-02-88 19-05-94 03-02-88 16-08-94 15-02-92 24-05-88 18-05-88 05-05-92 04-03-97 30-05-95 24-05-94
WO 9531564 A	23-11-95	AU 2415495 A EP 0759086 A AU 1321695 A EP 0736097 A AU 5157696 A WO 9630518 A AU 5282396 A WO 9631608 A	05-12-95 26-02-97 17-07-95 09-10-96 16-10-96 03-10-96 23-10-96
EP 0392225 A	17-10-90	AU 642865 B AU 5218390 A CA 2012778 A JP 3035783 A US 5614395 A US 5654414 A US 5650505 A	04-11-93 27-09-90 24-09-90 15-02-91 25-03-97 05-08-97 22-07-97

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 1992)

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Inte .ionales Aktenzeichen PCT/EP 97/02749

KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES PK 6 C12N15/82 C12N9/10 C12N15/54 A01H5/00 IPK 6 Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK **B. RECHERCHIERTE GEBIETE** Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole) IPK 6 C12N Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehorende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe) C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN Betr. Anspruch Nr. Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile Kategorie' 1-5. DE 42 27 061 A (INST GENBIOLOGISCHE Υ 8-11,15, FORSCHUNG) 17. Februar 1994 16.18 in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument 1,3-5, "Characterization G. GEIER AND K. GEIDER: Y 8-11,15, and influence on virulence of the 16,18 levansucrase gene from the fireblight pathogen Erwinia amylovora" PHYSIOLOGICAL AND MOLECULAR PLANT PATHOLOGY, Bd. 42, 1993, LONDON, GB, Seiten 387-404, XP002044933 in der Anmeldung erwähnt siehe Seiten 392-393 und die erste Absatz von Seite 400. siehe das ganze Dokument -/--Siehe Anhang Patentfamilie Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu IX I X entrehmen Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen \*A\* Veröffentichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist \*E\* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden "L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfindersacher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren an soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausaeführt) "O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht "P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist \*&\* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist Absendedatum des internationalen Recherchenberichts Datum des Abschlusses der internationalen Recherche 2 6 -11- 1997 3.November 1997 Bevollmächtigter Bedienstater Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentiaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Mateo Rosell, A.M. Fax: (+31-70) 340-3016

Formblett PCT/ISA/210 (Blaft 2) (Juli 1992)

1

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Int. Itionales Aktenzeichen
PCT/EP 97/02749

(Fortsetz	ung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN	PCT/EP S	,
ategorie <sup>o</sup>	Bezeichnung der Veröffentlichung, zoweit erforderlich unter Angabe der in Betracht komme	nden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	N. MARTINI ET AL.,: "Promoter sequences of a potato pathogenesis-related gene mediate transcriptional activation selectively upon fungal infection" MOLECULAR & GENERAL GENETICS, Bd. 236, 1993, BERLIN, DE, Seiten 179-186, XP002044934 in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument		2,8-11
A	EP 0 255 378 A (CALGENE INC) 3.Februar 1988 siehe das ganze Dokument, insbesonder siehe Seite 3, Zeile 27-31 - Zeile 52-56 siehe Seite 7, Zeile 27-65 - Seite 9, Zeile 10		1,5-7
A	R. HOFGEN AND L. WILLMITZER: "Transgenic potato plants depleted for the major tuber protein patatin via expression of antisense RNA" PLANT SCIENCE, Bd. 87, 1992, AMSTERDAM, NL, Seiten 45-54, XP002044935 in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument		1,8-11
A	WO 95 31564 A (THE GATSBY CHARITABLE FOUNDATION ) 23.November 1995 in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument,insbesonder Seiten 11-15		1,10-12, 16,18
A	EP 0 392 225 A (CIBA GEIGY AG) 17.0ktober 1990 siehe das ganze Dokument		1-12,14, 16,18

1

Formblatt PCT/ISA/210 (Fortsetzung von Blatt 2) (Juli 1992)

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Int. .ionales Aktenzeichen
PCT/EP 97/02749

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
DE 4227061 A	17-02-94	AU- 682472 B AU- 4946893 A CA 2142308 A WO 9404692 A EP 0663956 A HU 70977 A JP 8500015 T	09-10-97 15-03-94 03-03-94 03-03-94 26-07-95 28-11-95 09-01-96
EP 0255378 A	03-02-88	AU 612326 B AU 7630287 A AU 609724 B AU 7630387 A DE 3789582 D EP 0255377 A ES 2054676 T IN 170125 A JP 63119680 A JP 63112987 A US 5110728 A US 5608152 A US 5420034 A US 5315001 A	11-07-91 04-02-88 09-05-91 04-02-88 19-05-94 03-02-88 16-08-94 15-02-92 24-05-88 18-05-88 05-05-92 04-03-97 30-05-95 24-05-94
WO 9531564 A	23-11-95	AU 2415495 A EP 0759086 A AU 1321695 A EP 0736097 A AU 5157696 A WO 9630518 A AU 5282396 A WO 9631608 A	05-12-95 26-02-97 17-07-95 09-10-96 16-10-96 03-10-96 23-10-96
EP 0392225 A	17-10-90	AU 642865 B AU 5218390 A CA 2012778 A JP 3035783 A US 5614395 A US 5654414 A US 5650505 A	04-11-93 27-09-90 24-09-90 15-02-91 25-03-97 05-08-97 22-07-97

# This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning Operations and is not part of the Official Record

# **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

BLACK BORDERS

IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES

FADED TEXT OR DRAWING

BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING

SKEWED/SLANTED IMAGES

COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS

GRAY SCALE DOCUMENTS

LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT

REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY

# IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

OTHER: \_\_\_

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.

THIS PAGE BLANK (USPTO)